

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta**

Speciální chemicko – biologické obory  
Molekulární biologie a biochemie organismů



**Petra Kuchaříková**

## Molekulární mechanismy citlivosti k inzulínu v závislosti na obsahu tuku v dietě

Molecular mechanisms of insulin sensitivity in relation to fat content in diet

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Olga Horáková PhD.

Praha 2012

**Poděkování:**

Děkuji své školitelce Mgr. Olze Horákové PhD. za odborné vedení, velkou trpělivost, čas a cenné rady, které mi poskytla při psaní bakalářské práce. Také děkuji MUDr. Janu Kopeckému, DrSc. za možnost vypracovat práci na Oddělení biologie tukové tkáně FGÚ AVČR.

Děkuji své rodině a příteli za podporu a zázemí během studia.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6.5.2012

Petra Kuchaříková

## **Abstrakt**

Inzulínová resistance je klíčovou součástí patogeneze metabolického syndromu a diabetu 2. typu. Kosterní sval je důležitým článkem energetického metabolismu, protože po jídle přijímá, skladuje a spotřebovává většinu glukózy z krve. Inzulín ve svalu stimuluje translokaci váčků s glukózovými přenašeči na plazmatickou membránu a umožní tím zvýšený příjem glukózy do buněk. Ve svalu také zvyšuje míru syntézy proteinů, glykogenu a triacylglycerolů. Neschopnost kosterního svalu reagovat na normální hladiny inzulínu kolujícího v krvi vedou k narušení klíčových procesů energetického metabolismu. Dochází ke zvýšenému příjmu mastných kyselin z krevního řečiště, naopak schopnost oxidace mastných kyselin je snížena. Dochází k hromadění meziproduktů lipidového metabolismu v buňkách svalu a ty mohou rušit inzulínovou signalizaci. Zánětlivé cytokiny, hlavně  $\text{TNF}\alpha$ , aktivují ve svalu kinázy, které působí inhibičně na přenos inzulínového signálu. Inzulínová rezistence je léčena farmakologicky, důležitou součástí terapie je ale i omezení příjmu energie v potravě a fyzická aktivita. Příznivé účinky na inzulínovou citlivost svalu má i zvýšený příjem polynenasycených mastných kyselin.

**Klíčová slova:** Inzulínová rezistence, kosterní sval, energetický metabolismus, n-3 polynenasycené mastné kyseliny

## **Abstract**

Insulin resistance is a key component of the pathogenesis of metabolic syndrome and type 2 diabetes. Skeletal muscle is an important part of energy metabolism. It receives, stores and uses most of the glucose from blood. Insulin stimulates glucose uptake, by promoting translocation of glucose transporters to plasma membrane. It also increases the rate of protein, glycogen and triglyceride synthesis. When muscle is unable to respond to normal levels of circulating insulin, insulin resistance occurs. Insulin resistance leads to disruption of key metabolic processes. Fatty acid transport across the membrane is upregulated, whereas the ability to oxidize fatty acids is decreased. This imbalance leads to accumulation of lipid metabolites inside the cells. Lipid intermediates may interfere with insulin signalling. Inflammatory cytokines, particularly TNF $\alpha$ , activate kinases that may inhibit the insulin signal transmission. Insulin resistance may be treated pharmacologically, but also physical activity and decrease of energy intake are important part of therapy. Also polyunsaturated fatty acids have beneficial effects on muscle insulin sensitivity.

**Key words:** insulin resistance, skeletal muscle, energy metabolism, n-3 polyunsaturated fatty acids

**Seznam zkratek:**

|           |   |
|-----------|---|
| ACC 2     | acetyl-CoA karboxyláza 2 (acetyl-CoA carboxylase )  |
| aPKC      | atypická protein kináza C (atypical protein kinase C)   |
| Akt/PKB   | protein kináza B (protein kinase B)   |
| AMP       | adenozinmonofosfát (adenosine monophosphate)  |
| AMPK      | AMP-aktivovaná protein kináza (AMP-activated protein kinase)  |
| ATP       | adenozintrifosfát (adenosine triphosphate )   |
| β-HAD     | β-hydroxyacyl-CoA dehydrogenáza<br>(β-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase)                                      |
| CPT1,2    | karnitin-palmitoyltransferáza 1,2 (carnitine palmitoyltransferase 1,2)                                    |
| DAG       | diacylglycerol (diacylglycerol)   |
| DHA       | kyselina dokosaheptaenová (docosahexaenoic acid)  |
| eIF-4E    | translační iniciační faktor 4E eukaryot<br>(eukaryotic translation initiation factor 4E )                 |
| eNOS      | endoteliální NO syntáza (endothelial nitric oxide synthase)   |
| EPA       | kyselina eikosapentaenová (eicosapentaenoic acid)   |
| FA-CoA    | komplex mastné kyseliny s CoA (fatty acid-CoA)  |
| FABPpm    | vazebný protein mastných kyselin plazmatické membrány<br>(membrane-associated fatty acid binding protein) |
| FAT/CD36  | translokáza mastných kyselin (fatty acid translocase)   |
| FATP      | protein transportující mastné kyseliny (fatty acid transport protein)                                     |
| GLUT1,2,4 | glukózový přenašeč typu 1, 2 a 4 (glucose transporter type 1,2 and 4)                                     |
| GSK3      | kináza glykogen syntázy 3 (glycogen synthase kinase 3)  |
| HDL       | lipoprotein s vysokou hustotou (high-density lipoprotein)   |
| IGF       | inzulínu podobný růstový faktor (insulin-like growth factor)  |
| IKK       | kináza inhibitoru κB (inhibitor of κB (NF-κB) kinase)   |
| IL-6      | interleukin-6 (interleukine-6)  |
| IMCL      | intramyocelulární lipid (intramyocellular lipid)  |
| IRS1      | substrát inzulinového receptoru 1 (insulin receptor substrate 1)  |
| JNK       | c-Jun N-terminální kináza (c-Jun N-terminal kinase)   |
| LCFA      | mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (long-chain fatty acid)  |
| LCFA-CoA  | komplex mastné kyseliny s dlouhým řetězcem a CoA<br>(long-chain fatty acyl-CoA )                          |
| LDL       | lipoprotein o nízké hustotě (low-density lipoprotein)   |
| LPL       | lipoprotein lipáza (lipoprotein lipase)   |
| MAPK      | mitogeny aktivovaná protein kináza (mitogen-activated protein kinases)                                    |

|                    |   |
|--------------------|---|
| mTORC1             | (mammalian target of rapamycin complex 1)   |
| mTORC2             | (mammalian target of rapamycin complex 2)   |
| mTOT               | (mitochondrial target of TZDs)  |
| n-3 PUFA           | polynenasycené mastné kyseliny řady n-3<br>(n-3 polyunsaturated fatty acids)                                    |
| NO                 | oxid dusnatý (nitric oxide)   |
| p70 <sup>rsk</sup> | p70 ribozomální S6 kináza (p70 ribosomal s6 kinase)   |
| PDK1               | fosfoinositid dependentní protein kináza 1<br>(phosphoinositide-dependent kinase 1)                             |
| PGC1 $\alpha$      | (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha)  |
| PH                 | pleckstrin homologní doména (pleckstrin homology domain)  |
| PI3K               | fosfatidylinositol-3-kináza (phosphatidylinositol 3 kinase)   |
| PIP2               | fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate)  |
| PIP3               | fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát<br>(phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate)                                 |
| PKC $\theta$       | protein kináza C theta (protein kinase C theta)   |
| PP1                | fosfoprotein fosfatáza 1 (protein phosphatase 1)  |
| PPAR               | receptory aktivované proliferátory peroxisomů<br>(peroxisome proliferator-activated receptor)                   |
| SCD1               | stearoyl-CoA desaturáza (stearoyl-CoA desaturase 1)   |
| Ser                | serin (serine)  |
| Sirt1              | sitruin 1 (sirtuin 1)   |
| <i>Stat3</i>       | gen pro přenašeč signálu a aktivator transkripce typu 3<br>(signal transducer and activator of transcription 3) |
| T1DM               | diabetes 1. typu (type 1 diabetes mellitus)   |
| T2DM               | diabetes 2. typu (type 2 diabetes mellitus)   |
| TAG                | triacylglycerol (triacylglycerol, triglyceride)   |
| Thr                | threonin (threonine)  |
| TNF $\alpha$       | nádory nekrotizující faktor $\alpha$ (tumour necrosis factor $\alpha$ )   |
| Tyr                | tyrosin (tyrosine)  |
| TZD                | thiazolidindiony (thiazolidinedione)  |
| UCP1               | odpřahující protein 1 (uncoupling protein 1)  |
| VLDL               | lipoprotein o velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein)  |

## OBSAH:

|   |    |
|---|----|
| 1. Úvod.....  | 8  |
| 2. Inzulín.....   | 9  |
| 2.1. Funkční účinky inzulínu .....  | 9  |
| 2.2. Regulace sekrece inzulínu z $\beta$ -buněk .....   | 9  |
| 2.3. Signální kaskáda inzulínu v kosterním svalu .....  | 10 |
| 3. Molekulární mechanismy účinku inzulínu v kosterním svalu .....                                   | 12 |
| 3.1. Účinky inzulínu na glukózový metabolismus .....  | 12 |
| 3.2. Účinky inzulínu na syntézu a odbourávání glykogenu .....                                       | 13 |
| 3.3. Účinky inzulínu na syntézu a odbourávání proteinů .....  | 13 |
| 4. Metabolismus lipidů v kosterním svalu .....  | 15 |
| 5. AMP-aktivovaná protein kináza .....  | 18 |
| 6. Inzulínová rezistence .....  | 19 |
| 7. Mechanizmy narušení metabolismu kosterního svalu dietou s nevyváženým poměrem<br>nutrientů ..... | 21 |
| 7.1. Dieta s vysokým obsahem tuků .....   | 21 |
| 7.2. Dieta s vysokým obsahem cukrů .....  | 24 |
| 8. Ovlivnění inzulínové rezistence v kosterním svalu .....  | 25 |
| 8.1. Kalorická restrikce .....  | 25 |
| 8.2. Fyzická aktivita .....   | 26 |
| 8.3. Farmakologická léčba .....   | 28 |
| 8.4. Benefiční účinky n-3 PUFA .....  | 29 |
| 8.5. Kombinovaná léčba.....   | 30 |
| 9. Závěr .....  | 32 |
| Seznam použité literatury .....   | 33 |

## 1. Úvod

Obezita a diabetes 2. typu patří mezi onemocnění, jejichž prevalence se v poslední době prudce zvyšuje a v některých zemích jejich výskyt již dosáhl dokonce stupně epidemie. Příjem nadměrného množství potravy bohaté zejména na nasycené tuky a nedostatečná fyzická aktivita jsou hlavní faktory způsobující nárůst tělesné hmotnosti a rozvoj obezity. Obezita, diabetes 2. typu, vysoký krevní tlak, vysoké hladiny cholesterolu a triacylglycerolů v krvi jsou složkami tzv. metabolického syndromu. Metabolický syndrom u pacientů výrazně zvyšuje riziko infarktu myokardu a aterosklerózy. Součástí patogeneze diabetu 2. typu je inzulínová rezistence, stav necitlivosti periferních tkání k inzulínu. Inzulín v periferních tkáních stimuluje utilizaci glukózy z krevního řečiště. Pokud tkáně nejsou schopny glukózu z plazmy účinně využít, její zvyšující se hladina poškodí buňky sekretující inzulín a dojde k rozvoji diabetu 2. typu. Kosterní sval, tkáň která přijímá až 80% glukózy z krevního řečiště, se na vzniku inzulínové rezistence významně podílí. Metabolizmus kosterního svalu necitlivého k inzulínu je významně narušen, a to zejména díky hromadění lipidových metabolitů uvnitř buněk. Tyto metabolity ruší inzulínovou signalizaci na více úrovních a kromě narušení utilizace glukózy dochází i ke zhoršení dalších procesů, které inzulín reguluje. Důležitým enzymem regulujícím energetický metabolismus kosterního svalu je AMP-aktivovaná protein kináza. Tento enzym ovlivňuje jak glukózový, tak lipidový metabolismus a také reguluje biogenezi mitochondrií.

Cílem této práce je shrnout současné poznatky o rozvoji inzulínové rezistence v kosterním svalu v důsledku nadměrného příjmu energie a možnostech zlepšení tohoto stavu.



## 2. Inzulín

### 2.1 Funkční účinky inzulínu

Hlavní regulační úlohu v udržování stálé koncentrace glukózy v organismu v průběhu příjmu potravy, po něm a nalačno hrají hormony inzulín a glukagon. Inzulín je hormon sekretovaný do krve  $\beta$ -buňkami pankreatu. Na úrovni organismu hraje klíčovou úlohu v regulaci glukózového a lipidového metabolismu. Jeho hlavní funkcí je udržovat v krvi stálou hladinu glukózy (glykémii), která je u zdravého člověka nalačno v rozmezí 3,3 – 5,6 mM a po jídle do 8 mM. Postprandiálně inzulín inhibuje jaterní produkci glukózy. Je nezbytný pro příjem glukózy periferními tkáněmi, především játry, kosterními svaly a tukovou tkání. Působení inzulínu vede ke stimulaci syntézy glykogenu a jeho ukládání v játrech a svaích. Svým působením se podílí na řízení řady buněčných procesů, např. stimulace syntézy triacylglycerolů, esterifikace mastných kyselin v tukové tkáni, inhibice proteolýzy a lipolýzy, stimulace absorpce aminokyselin z krevního oběhu, inhibice autofágie a stimulace diferenciaci a růstu buněk.

Antagonisticky k inzulínu působí glukagon, který naopak při snížení glykémie stimuluje glykogenolýzu v játrech a vyplavení glukózy do krve (Dimitriadis et al., 2011). Nejvyšší koncentrace inzulínových receptorů na plazmatické membráně jsou v buňkách tkání důležitých pro energetický metabolismus – v játrech, kosterním svalu a tukové tkáni.

#### 2.1. Regulace sekrece inzulínu

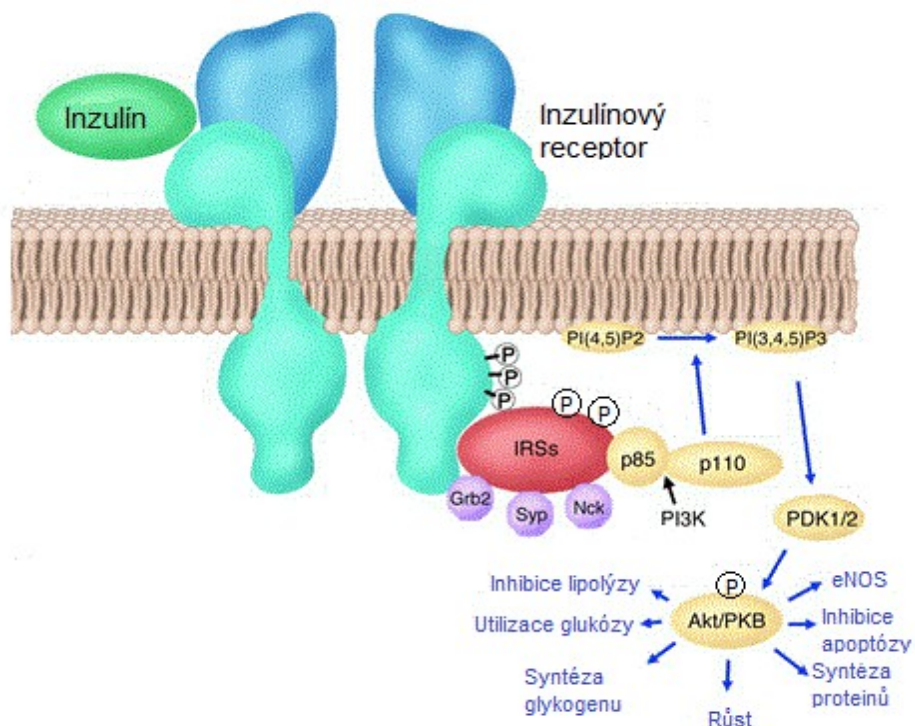
Sekrece inzulínu z  $\beta$ -buněk je regulována hladinou glukózy v krvi protékající pankreatem. Glukóza je vychytávána z krve a přenášena do  $\beta$ -buňky glukózovými přenašeči GLUT2 (GLUT2), kde je fosforylována hexokinázou, prvním enzymem glykolytické dráhy, na glukóza-6-fosfát. Ten pak podstupuje další procesy v glykolýze. Adenosintrifosfát (ATP), produkt odbourávání glukózy inhibuje draslíkové kanály na plazmatické membráně. Dojde k depolarizaci membrány a vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do buňky. Zvýšená hladina  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytoplazmě spustí exocytózu váčků s inzulínem (Holz a Habener, 1992).

### 2.3. Inzulínová signální kaskáda v kosterním svalu

Působení inzulínu ve svalové buňce je zprostředkováno vysoce regulovatelnou signální kaskádou, která začíná inzulínovým receptorem. Přenos signálu a jeho regulace je z velké míry uskutečňována mechanismem modifikací jejích jednotlivých členů, zejména pomocí aktivačních a inhibičních fosforylací proteinů signální kaskády.

Inzulínový receptor je transmembránový protein s proteintyrosinkinázovou aktivitou. Receptor je tvořený dvěma heterodimerními podjednotkami. Každá podjednotka má transmembránovou doménu  $\alpha$  a intracelulární  $\beta$ . Po vazbě inzulínu nebo inzulínu podobným růstového faktoru (IGF) na extracelulární domény dojde ke konformační změně vedoucí k autofosforylaci  $\beta$  domény a aktivaci její kinázové aktivity (Van Obberghen et al., 1985). Na receptoru se po aktivaci vytvoří vazebná místa pro další proteiny, které se dále podílí na přenosu signálu z receptoru dál do buňky. Jedním z těchto proteinů je substrát inzulínového receptoru 1 (IRS1). Po vazbě na inzulínový receptor je IRS1 fosforylován na několika tyrosinech (Tyr). Na IRS1 existuje přibližně 50 serinů (Ser) a threoninů (Thr) a přes 20 tyrosinů podléhajících fosforylaci. Fosforylací těchto míst je modulován signál přenášený přes IRS1. Pro přenos inzulínového signálu je u myši nutná fosforylace Tyr<sup>608</sup> a Tyr<sup>628</sup>. Takto fosforylovaný IRS1 se váže množství proteinů obsahujících SH2 doménu. Tyto proteiny poté mohou dále aktivovat několik dalších signálních drah, především fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K), která se podílí na regulaci translokace glukózových přenašečů GLUT4 (GLUT4) na plazmatickou membránu, a syntézy glykogenu, a mitogeny aktivovanou protein kinázu (MAPK), která reguluje genovou expresi a buněčný růst. Zatímco tyrosinové fosforylace vedou k aktivaci IRS1, serinová fosforylace na IRS1 je pro přenos inzulínového signálu pro translokaci GLUT4 váčků inhibiční. Bylo prokázáno, že faktor nekrotizující nádory (TNF $\alpha$ ), volné mastné kyseliny, hyperinzulinémie a další faktory přítomné u inzulín-rezistentních jedinců podporují aktivaci kináz, které tyto serinové zbytky fosforylují (Gual et al., 2005). PI3K je lipidová kináza. Skládá se z p110 katalytické a p85 regulační podjednotky. Právě p85 adaptorová podjednotka PI3K se váže na IRS1. Podjednotka p85 se váže konkrétně na fosforylované Tyr<sup>608</sup> a Tyr<sup>939</sup> IRS1 (Sun et al., 1993). Po vazbě na p85 je PI3K aktivována (Myers et al., 1992). PI3K fosforyluje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2) na fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PIP3). PIP3 funguje v buňce jako signální molekula a mimo jiné aktivuje fosfoinositid-dependentní kinázu 1 (PDK1). Tato kináza pak aktivuje další členy inzulínové signální kaskády, atypickou protein kinázu C (aPKC) a protein kinázu B (Akt/PKB). Tyto kinázy předávají signál pro translokaci váčků s přenašeči GLUT4 na plazmatickou membránu (Chou et al., 1998);(Alessi et al.,1997).

Významným uzlem v inzulinové signalizaci je enzym Akt/PKB. Je zahrnut nejen v regulaci translokace váčků s GLUT4 přenašeči, ale i jiných procesech (Obrázek 1). Akt/PKB je plně aktivní po fosforylaci Thr<sup>308</sup> a Ser<sup>473</sup>. Fosforylaci Ser<sup>473</sup> zajišťuje komplex proteinů mTORC2 a fosforylaci Thr<sup>308</sup> PDK1 (Sarbassov et al., 2005). Akt/PKB může být kromě fosforylace PDK1 a mTORC2 komplexem aktivována také přímo PIP3, protože obsahuje pleckstrin homologní (PH) doménu, která PIP3 dokáže vázat. Aktivovaná Akt/PKB v buňce stimuluje utilizaci glukózy, ale i další procesy, například syntézu glykogenu nebo translaci mRNA a syntézu proteinů. Po aktivaci se frakce Akt/PKB translokuje do jádra a brání apoptóze. Akt/PKB stimuluje vazodilataci a tím vyšší přítok nutrienů k buňkám. Podporuje růst a proliferaci a inhibuje lipolýzu (Lawlor a Alessi, 2001).



**Obr. 1: Signální kaskáda inzulinu a účinky aktivované Akt/PKB**

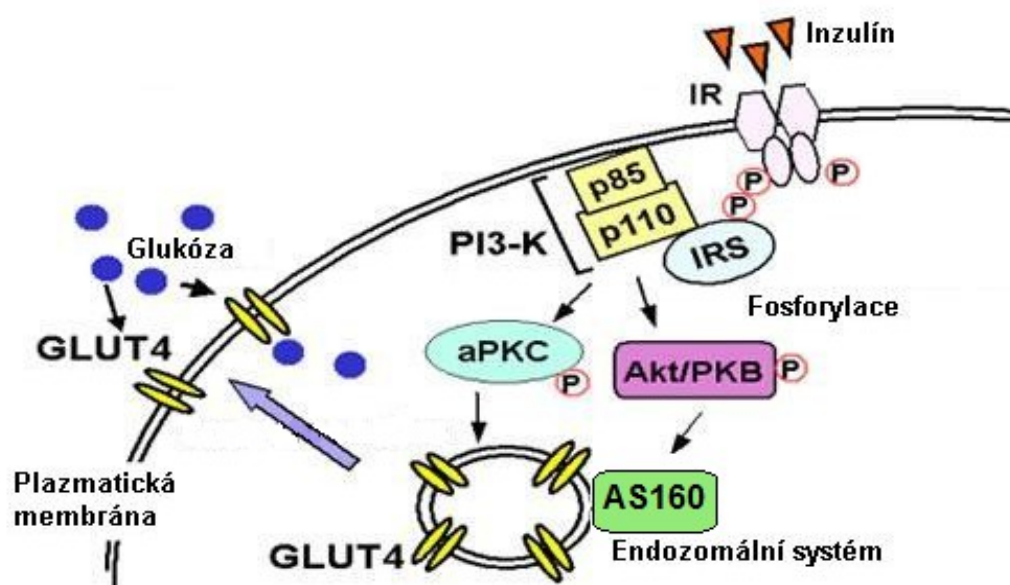
(převzato a upraveno z van den Berghe, 2004)

Po vazbě inzulinu na inzulinový receptor je aktivována jeho protein-tyrosin kinázová aktivita a dojde k autofosforylaci. Na fosforylované tyrosiny se naváže substrát IRS1, který je poté inzulinovým receptorem fosforylován. Na fosforylovaný IRS1 se naváže regulační podjednotka PI3K. Aktivovaná PI3K tvoří PIP3, signální molekulu, která mimo jiné aktivuje kinázu PDK1, která fosforyluje a aktivuje Akt/PKB. Akt/PKB hraje klíčovou roli v regulaci řady buněčných procesů například glukózového a lipidového metabolismu, apoptózy a buněčné proliferace.

### 3. Molekulární mechanismy účinku inzulínu v kosterním svalu

#### 3.1. Účinky inzulínu na glukózový metabolismus

Sval je jednou z klíčových tkání pro udržování glukózové homeostázy organismu. Po stimulaci inzulínem využívá z krve až 70 – 80% glukózy (Shulman et al., 1990). Glukóza je do buňky kosterního svalu přenášena glukózovými přenašeči GLUT4. GLUT4 přenašeče jsou uloženy v membráně váčků endozomálního systému buňky. GLUT4 jsou na membráně permanentně obměňovány, váčky s přenašeči neustále cirkulují mezi plazmatickou membránou a intracelulárním kompartmentem. Po vazbě inzulínu na receptor je přes PI3K aktivována PDK1, která dále fosforyluje Akt/PKB a atypickou PKC. Tyto dvě kinázy pak zvýší míru translokace váčků s přenašeči na plazmatickou membránu (Obrázek 2). Akt/PKB fosforyluje a inhibuje GAP doménu proteinu AS160. AS160 v aktivní formě inhibuje signalizaci pro přenos GLUT4 na membránu. Inhibice GAP domény AS160 zajistí, že proteiny dále v signální kaskádě zůstanou aktivní a dojde ke stimulu přenosu GLUT4 na membránu buňky (Sano et al., 2003). Výsledkem je zvýšení transportu glukózy do buňky způsobené zvýšením translokace GLUT4 přenašečů na cytoplazmatickou membránu a snížením jejich internalizace. Bylo změřeno, že míra exocytózy váčků s GLUT4 se po inzulínové stimulaci zvýšila asi 20x a míra endocytózy se snížila asi 3x. Tento mechanismus umožňuje efektivní utilizaci glukózy (Pessin et al., 1999).



**Obr. 2 : Regulace utilizace glukózy po inzulínové stimulaci.**

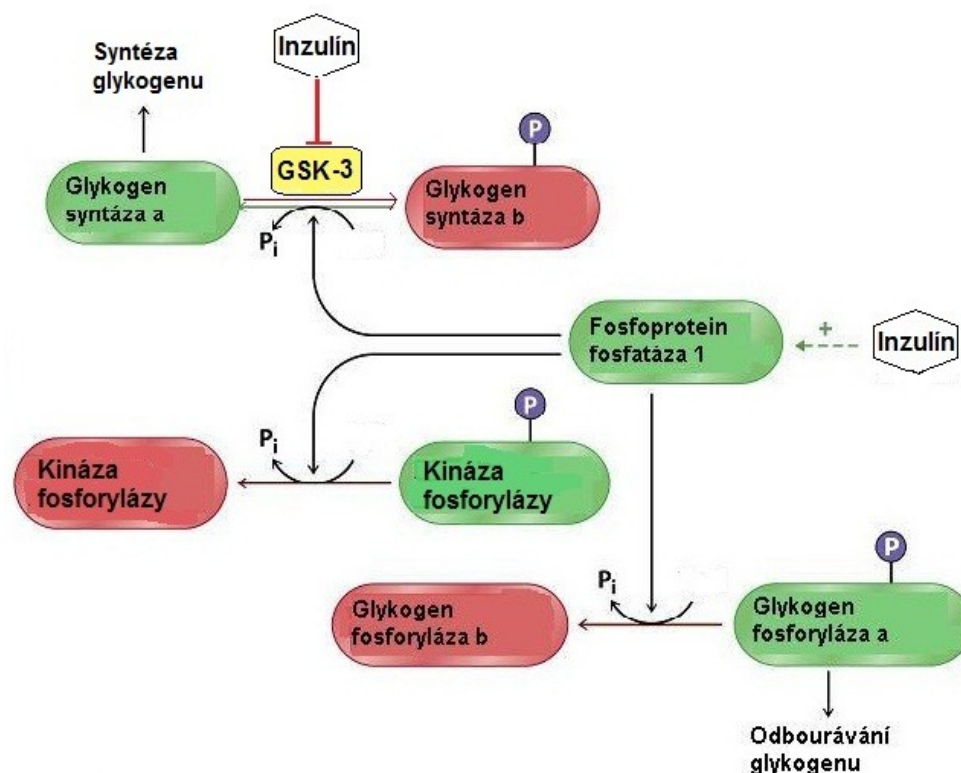
(převzato z ans.kobe-u.ac.jp, 2007)

*Vazba inzulínu na IR aktivuje PI3K za účasti IRS1. PI3K aktivuje PDK, která zprostředkuje aktivaci aPKC a Akt/PKB. Každá z těchto kináz pak dává signál k translokaci GLUT4 váčků na membránu. GLUT 4 přenašeče pak vychytávají glukózu a přenášejí ji do buňky.*

### 3.2. Účinky inzulínu na syntézu a degradaci glykogenu

Inzulín stimuluje ukládání glykogenu v buňce zvýšením příjmu glukózy z krevního oběhu a zvýšenou syntézou glykogenu. Hormon aktivuje enzym glykogen-syntázu prostřednictvím jeho defosforylace na klíčových serinech. Tento proces je uskutečňován inhibicí kináz, a aktivací fosfatáz. Po spuštění inzulínové signální kaskády a aktivací PI3K, Akt/PKB fosforyluje kinázu glykogen syntázy 3 (GSK3) na Ser<sup>21</sup> nebo Ser<sup>9</sup> a tím enzym inaktivuje. Inhibicí GSK3 se sníží míra fosforylace glykogen syntázy na klíčových serinových zbytcích, dojde k její aktivaci a tím se zvýší syntéza glykogenu (Obrázek 3); (Cross et al., 1995).

Proces syntézy a degradace glykogenu je řízen fosfoproteinfosfatázou (PP1), podle aktuální glykémie organismu. PP1 reguluje aktivitu enzymu glykogen fosforylázy, enzymu odbourávajícího glykogen. Při nízké glykemii je fosforyláza aktivována fosforylací pomocí enzymu kinázy fosforylázy a silně váže PP1, aby eliminovala její fosfatázovou aktivitu. Glykogen je odbouráván a glukóza je použita jako energetický substrát nebo je vyplavena do krevního řečiště. Naopak při vysoké glykemii po inzulínovém stimulu fosfatáza disociuje, defosforyluje a inaktivuje glykogen fosforylázu i kinázu fosforylázy a umožní aktivaci glykogen syntázy a tvorbu glykogenu (Brady a Saltiel, 2001). Inzulín neaktivuje PP1 v celé buňce, ale zvyšuje aktivitu fosfatáz nacházejících se přímo na glykogenových partikulích. Proteiny zodpovědné za takto kompartmentalizovanou odpověď jsou G<sub>M</sub> podjednotky na PP1, vážící se na glykogenové partikule. Tyto podjednotky pak slouží jako „molekulární lešení“ propojující enzym přímo s jeho substrátem, glykogen syntázu a fosforylázu s glykogenem, do makromolekulárního komplexu, který pružně reaguje na energetické nároky organismu (Cross et al., 1997).



**Obr. 3 : Regulace syntézy glykogenu inzulínem.**

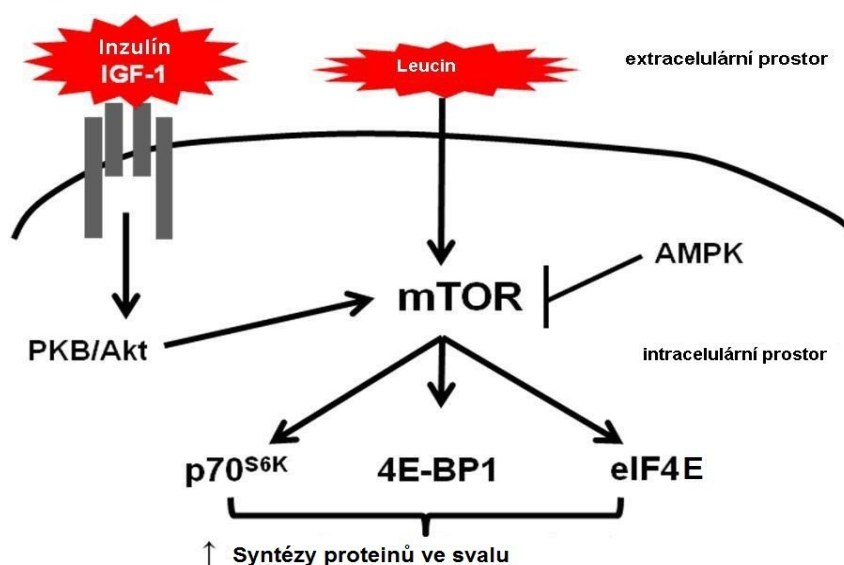
(převzato a upraveno z Principles of Biochemistry, 2006)

Po vazbě inzulínu na receptor je aktivována PP1. Ta inaktivuje enzymy klíčové pro odbourávání glykogenu kinázu fosforylázy a glykogen fosforylázu. Defosforylaci naopak aktivuje glykogen syntázu a umožní tvorbu zásobního glykogenu.

### 3.3. Účinky inzulínu na syntézu a degradaci proteinů

Inzulín se podílí také na regulaci metabolismu proteinů. Zvyšuje míru syntézy proteinů a za určitých podmínek tlumí jejich degradaci. Tyto účinky jsou zprostředkovány komplexem proteinů mTORC1. Protein mTOR z komplexu mTORC1 patří do skupiny PI3K proteinů, ale zdá se, že funguje spíš jako serinová než lipidová kináza. Inzulín aktivuje tuto kinázu fosforylací prostřednictvím Akt/PKB, ale je možné, že je aktivována i jiným způsobem (Navé et al., 1999). mTORC1 ovládá translační aparát buňky přímou fosforylací důležitých substrátů. Fosforyluje a aktivuje p70 ribozomální S6 kinázu ( $p70^{\text{rsk}}$ ).  $p70^{\text{rsk}}$  ke své aktivaci potřebuje ještě PIP3 dependentní fosforylaci, pravděpodobně katalyzovanou kinázou PDK1. Plně aktivní  $p70^{\text{rsk}}$  fosforyluje ribozomální S6 protein a spustí biosyntézu ribozomů. mTORC1 také fosforyluje inhibitor translačního iniciačního faktoru 4E eukaryot (eIF-4E) a tím umožní a podpoří translaci (Proud, 2006).

Schopnost a míra syntézy proteinů svalovou buňkou také závisí na dostupnosti aminokyselin v krevním řečišti. Inzulín stimuluje enzym endoteliální NO syntázu (eNOS), který způsobuje vazodilataci cév. Zajistí tím vyšší přítok živin a mezi nimi i aminokyselin ke svalu. Aminokyseliny, zejména leucin, jsou hlavními aktivačními substráty mTORC1 a nezávisle na signalizaci Akt/PKB zvyšují syntézu proteinů v buňce (Obrázek 4) (Timmerman et al., 2010). Specifickým inhibitorem PI3K je wortmanin. Bylo prokázáno, že inhibice PI3K wortmaninem, za současné stimulace svalových buněk inzulínem, snižuje efekty inzulínu z 80%. Stimulace inzulínem a leucinem za inhibice PI3K snížila účinky inzulínu jen o 60%. To je důležitý poznatek pro pochopení mechanismů účinků inzulínu na inzulín-rezistentní buňku (Hinault et al., 2004).



**Obr.4 : Aktivace mTOR inzulínem a leucinem**

(převzato z Pimentel a Zemdegs, 2009)

*Inzulín stimuluje vazodilataci cév v kosterním svalu a zajistí tím vyšší přítok aminokyselin k myocytům. Leucin i inzulín působí na protein mTOR z komplexu mTORC2 a spustí translaci a syntézu proteinů ve svalu.*

#### 4. Metabolismus lipidů v kosterním svalu

Lipidy jsou jedním z nejvýznamnějších zdrojů energie v lidském těle. Hlavní zásobárnou lipidů je tuková tkáň, kde jsou skladovány ve formě triacylglycerolů (TAG). Inzulínová rezistence a diabetes 2. typu (T2DM) jsou spojeny s výrazným ukládáním tuků v ostatních tkáních, např. v kosterním svalu nebo játrech. Meziprodukty metabolismu lipidů jako diacylglyceroly (DAG), ceramidy a komplexy kyselin s dlouhým řetězcem a koenzymu A (LCFA-CoA) se mohou hromadit v buňce a interferovat s inzulínovou signalizací. Kapacita přenašečů mastných kyselin, rychlost oxidace mastných kyselin a obrat intramyocelulárních



triacylglycerolů jsou hlavní faktory ovlivňující míru hromadění těchto lipidových molekul.

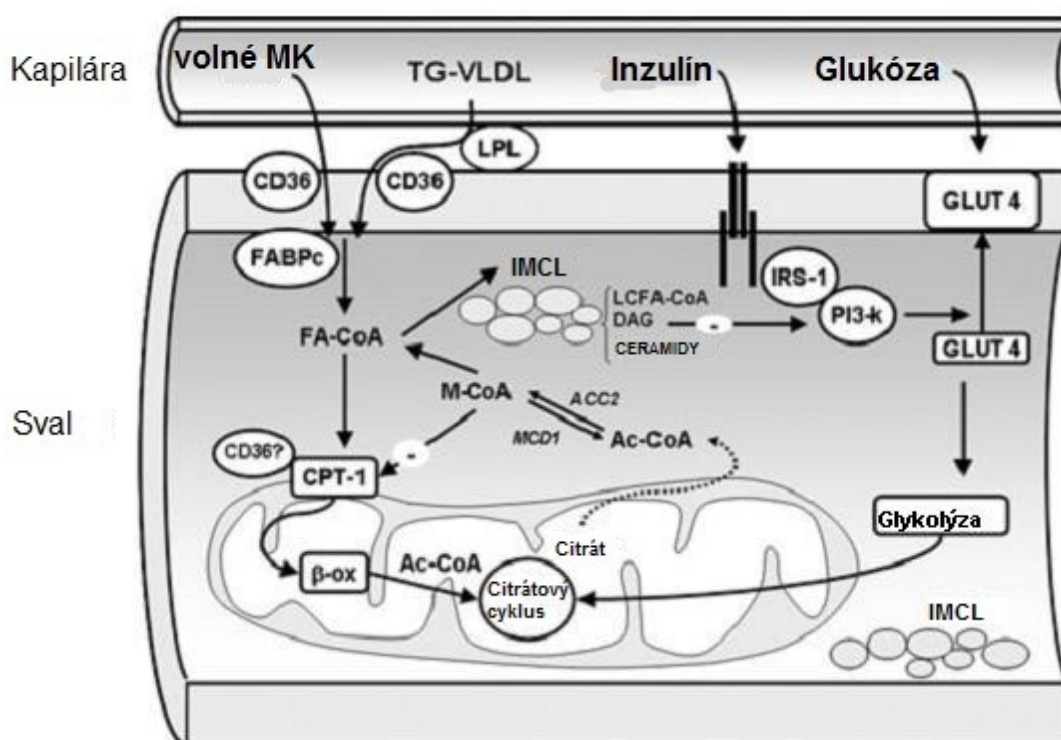
Mastné kyseliny uvolněné z tukové tkáně jsou v plazmě přenášeny ve formě volných mastných kyselin navázaných na albumin nebo vázaných v TAG ve formě lipoproteinů. Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL) jsou hydrolyzovány endoteliální lipoprotein-lipázou (LPL) na lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) a z nich jsou pak dále uvolňovány volné mastné kyseliny. Do myocytu se mastné kyseliny s krátkým a středně dlouhým řetězcem dostávají difuzí přes membránu a mastné kyseliny s dlouhým řetězcem pomocí membránových přenašečů. Hlavními přenašeči mastných kyselin do svalu jsou translokáza mastných kyselin FAT/CD36 (FAT/CD36), vazebný protein mastných kyselin asociovaný s plazmatickou membránou (FABPpm) a proteiny transportující mastné kyseliny (FATP 1-6). Nejdůležitějším proteinem pro přenos mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LCFA) je FAT/CD36 (Consitt et al., 2009).

Po aktivaci inzulinové signální kaskády přes PI3K dojde k translokaci FAT/CD36 z endozomálních kompartmentů na plazmatickou membránu. Při fyzické aktivitě také dojde k translokaci, ale prostřednictvím odlišné signalizace (Luiken et al., 2003).

Po vstupu do myocytu je mastná kyselina aktivována enzymem acyl-CoA syntetázou za vzniku komplexu mastné kyseliny s CoA (FA-CoA). Komplex pak buď vstoupí do mitochondrie, kde je oxidován, nebo je využit pro syntézu intramyocelulárních lipidů (IMCL), nejčastěji TAG (Obrázek 5). Zatímco FA-CoA s krátkým nebo středně dlouhým řetězcem pravděpodobně vstupují do mitochondrie difuzí přes membránu, LCFA-CoA potřebují ke vstupu do mitochondrie modifikaci. Přes vnější mitochondriální membránu přecházejí difuzí jako acyl-karnitinový komplex, který syntetizuje enzym karnitin-palmitoyltransferáza 1 (CPT1). Bylo zjištěno, že právě CPT1 je klíčový enzym určující vstup LCFA-CoA do buňky a tím, jejich oxidaci v mitochondrii (Bruce et al., 2006). Přes vnitřní mitochondriální membránu je komplex přenášen acyl-karnitin translokázou a na vnitřní straně vnitřní mitochondriální membrány je komplex opět převeden na původní FA-CoA enzymem CPT2 a uvolněn do matrix. Zde je v procesu  $\beta$ -oxidace, odbouráván po jednotlivých acetyl-CoA klíčovém enzymem  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA dehydrogenázou ( $\beta$ -HAD). Bylo zjištěno, že aktivita  $\beta$ -HAD vysoce koreluje s mírou  $\beta$ -oxidace ve svalu (Grinton, 1992). Acetyl-CoA je pak odbouráván v dalších procesech v Krebsově cyklu a elektron-transportním řetězci, za vzniku hlavního energetického substrátu ATP (Consitt et al., 2009). Zvýšením koncentrace acetyl-CoA vstupujícího do Krebsova cyklu se zvýší i koncentrace citrátu v matrix mitochondrie i v cytoplazmě. Citrát stimuluje aktivaci enzymu acetyl-CoA karboxylázy 2 (ACC2), který přeměňuje acetyl-CoA na malonyl-CoA.



Malonyl-CoA je alosterickým inhibítozem CPT1, který pak limituje příjem FA-CoA a  $\beta$ -oxidaci. Když jsou nutrienty v nerovnováze, například díky zvýšeným energetickým požadavkům v průběhu cvičení, poklesne hladina citrátu a malonyl-CoA. To vede k opětovné aktivaci CPT1 a obnovení transportu mastných kyselin do mitochondrií a jejich následné oxidaci. Nerovnováha mezi příjmem mastných kyselin do buňky a jejich vstupem do mitochondrie nakonec vede ke hromadění meziproductů metabolismu jako jsou LCFA-CoA, DAG a ceramidy. Tyto metabolity pak mohou rušit inzulinovou signalizaci (Rasmussen et al., 2002).



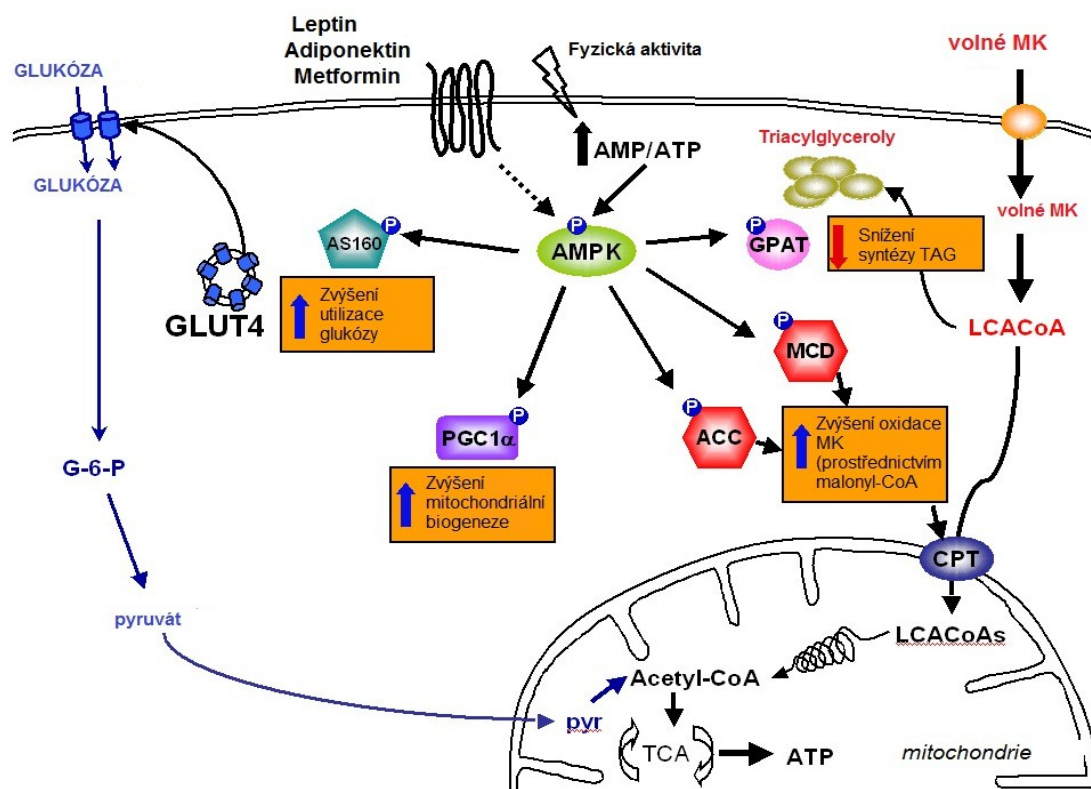
**Obr. 5: Metabolismus v myocyty a jeho regulace malonyl-coA**

(převzato z Corpeleijn et al., 2009)

Mastné kyseliny vstupují do myocyty FAT/CD36 přenašečem, poté jsou buď využity pro syntézu IMCL nebo vstoupí do mitochondrie, kde jsou oxidovány a acetyl-CoA vzniklé odbouráním mastné kyseliny putují do Krebsova cyklu. Glukóza je odbourávána v procesu glykolýzy a poté v citrátovém cyklu. Zvýšená hladina citrátu v myocyty stimuluje syntézu malonyl-CoA. Malonyl-coA inhibuje přenos mastných kyselin do mitochondrie a tak tlumí oxidaci mastných kyselin. Takto je upřednostněna degradace glukózy před odbouráváním mastných kyselin. Mastné kyseliny jsou uloženy v myocyty jako IMCL.

## 5. AMP-aktivovaná protein kináza

Důležitým enzymem, který ovlivňuje metabolismus myocytu je AMP-aktivovaná kináza (AMPK). AMPK je senzorem energetického stavu buňky. Je aktivována adenosinmonofosfátem (AMP), produktem hydrolýzy ATP v pracujícím svalu, a metforminem. V případě zvýšení poměru AMP/ATP v buňce AMPK v myocytu spouští katabolické dráhy a inhibuje dráhy anabolické. Zvyšuje translokaci váčků s GLUT4 přenašeči na plazmatickou membránu a tím zlepšuje inzulínovou citlivost kosterního svalu. AMPK nepřímo podporuje oxidaci mastných kyselin působením na regulátor vstupu mastných kyselin do buňky, malonyl-CoA. Tento enzym také působením na transkripční faktor PGC1 $\alpha$  podporuje mitochondriální biogenezu. Aktivace AMPK agonisty nebo fyzickou aktivitou vede ke zlepšení metabolismu svalu na několika úrovních (Obrázek 6). Díky pozitivním účinkům na inzulínovou citlivost je AMPK důležitým cílem pro potenciální vývoj nových preparátů na vylepšení inzulínové citlivosti inzulín-rezistentních a diabetických pacientů (Mihaylova a Shaw, 2011).



**Obr. 6 : Účinky AMPK na metabolismus kosterního svalu**

(převzato z Kraegen et al., 2009)

AMPK aktivovaná metforminem, adiponektinem, leptinem nebo fyzickou aktivitou ve svalu stimuluje utilizaci glukózy, mitochondriální biogenezi a oxidaci mastných kyselin. Zároveň snižuje syntézu TAG.

## 6. Inzulínová rezistence

Inzulínová rezistence je klíčový element v patogenezi metabolického syndromu a T2DM. Tato onemocnění už v celém světě dosáhla stupně epidemie, proto je velmi důležité porozumět mechanismům jejich rozvoje. Inzulínová rezistence je definována jako stav snížené citlivosti periferních tkání k normálním hladinám inzulínu kolujícího v plazmě. Buňky nejsou schopné využít glukózu v důsledku neefektivní inzulínové signalizace. Nesprávná životospráva, nedostatek pohybu, nevyvážená strava a další faktory se významně podílí na vzniku inzulínové rezistence.

Zdraví jedinci energii získanou potravou ukládají v podobě TAG v tukové tkáni. Tato schopnost uložit energii umožňuje lidem vyrovnat se s nerovnoměrným příjmem potravy. Dlouhodobý příjem nadměrného množství potravy tak u lidí způsobuje nárůst tělesné hmotnosti a rozvoj obezity. U obézních jedinců je příjem živin mnohem vyšší než skladovací kapacita tukové tkáně. Důsledkem toho dojde ke zvýšení hladiny volných mastných kyselin v plazmě. Tuky se ve formě TAG a meziproduktů jejich metabolismu ukládají do jiných tkání, jako jsou játra a kosterní svalstvo, kde narušují inzulínovou signalizaci. Zhoršená signalizace pak neumožní dostatečnou utilizaci glukózy po inzulínovém stimulu a dochází k rozvoji inzulínové rezistence. Kosterní svalstvo využívá až 80% veškeré glukózy z plazmy a proto je schopnost této tkáně reagovat na inzulínovou signalizaci důležitou součástí glukózového metabolismu organismu (Savage et al., 2007). Diabetes je charakterizován jako absence inzulínu v krvi, existují ale dvě formy této nemoci s rozdílnými příčinami.

Diabetes 1. typu (T1DM) je autoimunitní nemoc, která nebývá spojena s obezitou. Rozvine se i pacientů s genetickou predispozicí. V důsledku neadekvátní imunitní reakce jsou zničeny  $\beta$ -buňky pankreatu a už nejsou dále schopné sekretovat inzulín. U pacientů s T1DM je jedinou možností léčby inzulínová substituce (Van Belle et al., 2011).

U vzniku T2DM není dysfunkce  $\beta$ -buněk příčinou diabetu jako u T1DM, ale důsledkem rozvoje inzulínové rezistence. Počínající inzulínovou rezistencí vyrovnávají  $\beta$ -buňky pankreatu vyšší produkcí inzulínu, aby udržely stálou hladinu glukózy v krvi. Při pokročilejší inzulínové rezistenci už kompenzace zvýšenou sekrecí inzulínu nestačí a hladina glukózy se přesto zvyšuje. Vysoké koncentrace glukózy v krvi  $\beta$ -buňky poškodí a nemoc se rozvine do diabetického stavu. Obezita, T2DM, vysoký krevní tlak, vysoké hladiny cholesterolu a TAG v krvi jsou hlavními složkami metabolického syndromu (Savage et al., 2007).

Obezita je kromě nadměrného ukládání tuků spojena také se systémovým chronickým zánětem. Ten je charakterizován pozměněnou produkcí cytokinů a aktivací zánětlivých signálních drah. Bylo prokázáno, že v tukové tkáni i kosterním svalstvu obézních lidí i myši je zvýšené množství makrofágů (Weisberg et al., 2003); (Torres et al., 2004). Dochází ke zvýšené produkci zánětlivých cytokinů, zejména TNF $\alpha$  a interleukinu-6 (IL-6). TNF $\alpha$  aktivuje v buňce nejrůznější signální dráhy, z nichž některé jsou považovány za inhibiční pro inzulinovou signalizaci. TNF $\alpha$  je sekretován makrofágy z tukové tkáně, kosterního svalstva, ale i samotnými myocyty. U diabetických a inzulin-rezistentních pacientů i potkanů byla exprese TNF $\alpha$  ve svalu čtyřikrát vyšší než u zdravých jedinců (Saghizadeh et al., 1996). V plazmě inzulin-rezistentních jedinců výzkumy zvýšené koncentrace zánětlivých cytokinů neprokázaly (Petersen et al., 2004) a nebyl prokázán ani vztah mezi expresí TNF $\alpha$  mRNA ve svalu a jeho koncentrací v plazmě ve vztahu k inzulinové citlivosti (Carey et al., 2004).

Hormonem jehož hladiny jsou výrazně zvýšeny u obézních jedinců je leptin. Leptin je vylučován z tukové tkáně a je důležitým regulátorem příjmu potravy. Podílí se na udržování energetické homeostázy, omezuje příjem potravy a stimuluje energetický výdej. Plazmatické hladiny leptinu pozitivně korelují s množstvím tuku v organismu. Leptin tak signalizuje množství tuku v organismu a posiluje výdej energie působením na hypothalamus. Působí proti ukládání tuku v jiných orgánech než je tuková tkáň. Ve svalových buňkách aktivuje AMPK, která stimuluje oxidaci mastných kyselin a utilizaci glukózy. U obézních lidí je hladina leptinu sice vysoká, ale tělo na něj nedokáže dostatečně reagovat. Tento stav je nazýván leptinovou rezistencí (Minokoshi et al., 2002).

Adiponektin je další významný hormon ovlivňující metabolismus. Je sekretován výhradně tukovou tkání a má antidiabetické účinky. Koncentrace adiponektinu v plazmě negativně koreluje s množstvím tuku v těle, BMI a mírou inzulinové rezistence. Adiponektin v kosterním svalu podobně jako leptin aktivuje AMPK, která pak stimuluje oxidaci mastných kyselin a translokaci GLUT4, tím zlepšuje inzulinovou citlivost. Také působí proti ukládání TAG v buňce. Na rozdíl od leptinu má adiponektin menší vliv na příjem potravy a tělesnou hmotnost (Yamauchi et al., 2002).

## 7. Mechanizmy narušení metabolismu kosterního svalu dietou s nevyváženým poměrem nutrientů

### 7.1. Dieta s vysokým obsahem tuků

Nadměrný příjem tuků v potravě je u pacientů i zvířecích modelů spojen s mnoha změnami v metabolismu. Dochází nárůstu tělesné hmotnosti a zvětšení tukové tkáně. Zvýší se plazmatické hladiny volných mastných kyselin. Tuk se ukládá do jater a svalové tkáně ve formě TAG a lipidových metabolitů. Bylo prokázáno, že hromadění lipidových metabolitů uvnitř myocytů významně zhoršuje inzulinovou signalizaci (Krssak et al., 1999).

U obézních pacientů a nemocných T2DM byla pozorována zvýšená utilizace mastných kyselin z krevního řečiště. Rozhodující roli pro utilizaci mastných kyselin, může hrát množství a aktivita transportních proteinů mastných kyselin jako jsou FABP a FAT/CD36. Aktivita a množství vazebného proteinu mastných kyselin na plazmatické membráně (FABPpm) negativně koreluje s inzulinovou citlivostí. V lidské studii byla pozorována zvýšená exprese FABPpm u zdravých jedinců konzumujících dietu s vysokým obsahem tuků (Roepstorff et al., 2004) i inzulin-rezistentních pacientů (Simoneau et al., 1999).

Zdá se, že na vyšší dostupnost mastných kyselin v plazmy buňka odpovídá zvýšenou expresí přenašečů mastných kyselin. Naopak kapacita mitochondrií oxidovat mastné kyseliny je u obézních inzulin-rezistentních jedinců zhoršená (Petersen et al., 2004). Bylo prokázáno, že aktivita enzymu CPT1, limitujícího enzymu pro vstup mastných kyselin do mitochondrie, citrát syntázy, enzymu Krebsova cyklu, a cytochrom oxidázy, součásti elektron-transportního řetězce, je u obézních inzulin-rezistentních pacientů snížena (Simoneau et al., 1999). Také aktivita  $\beta$ -HAD, enzymu klíčového pro odbourávání mastných kyselin, je u obézních jedinců zhoršena (Kim et al., 2000). U pacientů s T2DM je v mitochondriích kosterního svalu také snížena celková aktivita elektron-transportního řetězce. Tuto skutečnost vysvětluje částečně také snížený obsahem mtDNA ve svalových buňkách dobrovolníků, tudíž nedostatečnou expresí klíčových proteinů (Ritov et al., 2005). Kromě snížené aktivity klíčových enzymů byly u mitochondrií pozorovány také změny v jejich velikosti. Elektronovou transmisí mikroskopií bylo zjištěno, že mitochondrie obézních lidí a pacientů s T2DM jsou až o 35% menší než u štíhlých dobrovolníků a vykazují odlišnou morfologii. Velikost mitochondrií u obézních a diabetických pacientů korelovala s inzulinovou citlivostí kosterního svalu (Obrázek 7) (Kelley et al., 2002).

Zvýšená míra vstupu mastných kyselin do myocytu bez adekvátního zvýšení oxidace mastných kyselin vede k hromadění lipidů a lipidových meziproduktů. U zdravých, inzulín-rezistentních štíhlých pacientů i potkanů krmených vysokotukovou dietou byla potvrzena negativní korelace mezi množstvím IMCL a inzulínovou citlivostí. TAG jsou metabolicky celkem inertní látky, a jejich množství v myocytu nepříliš dobře koreluje s inzulínovou citlivostí. Zvýšené množství TAG ve svalech mají i trénovaní sportovci vysoce citliví k inzulínu. Mnohem spolehlivějším ukazatelem zhoršené inzulínové citlivosti jsou meziprodukty lipidového metabolismu, z nichž některé fungují dokonce jako signální molekuly. Jedná se hlavně o ceramidy, DAG a LCFA-CoA. Tyto látky mohou hrát klíčovou roli v navození inzulínové rezistence (Consitt et al., 2009).

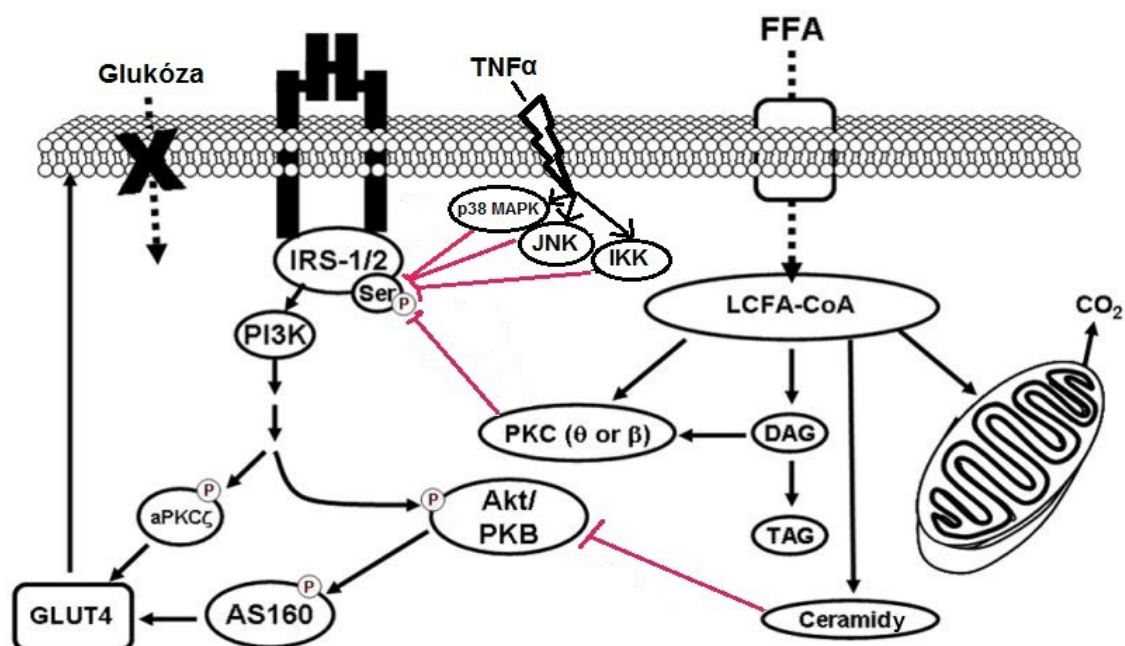
Ceramidy vznikají v kosterním svalu hydrolýzou sfingomyelinu nebo syntézou *de novo* z nasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Syntéza ceramidů je primárně závislá na dostupnosti mastných kyselin. Množství ceramidu v myocytu tak koreluje s hladinou volných mastných kyselin v plazmě. Zvýšený obsah ceramidu až o 100% byl potvrzen v myocytech inzulín-rezistentních i obézních lidí. V myocytu ceramidy tlumí inzulínovou signalizaci pravděpodobně snížením přenosu signálu přes Akt/PKB. V myocytech se zvýšeným obsahem ceramidů byla pozorována snížená fosforylace Akt/PKB na Ser<sup>473</sup>, klíčovém zbytku pro plnou aktivaci Akt/PKB (Adams et al., 2004). Zablokování syntézy ceramidů vedlo k obnovení signalizace přes Akt/PKB, což je v souladu s teorií, že ceramidy působí inhibičně právě na Akt/PKB (Holland et al., 2007). Jiní autoři významnou korelaci mezi zvýšeným obsahem ceramidu a inzulínovou citlivostí neprokázali. Je možné, že existuje hranice, určující jaké množství ceramidu ovlivňuje inzulínovou citlivost a jaké ještě ne. S obezitou a inzulínovou rezistencí jsou spojeny i jiné defekty v inzulínové signalizaci. Zhoršená fosforylace Akt/PKB tak může být důsledkem narušení jiných, nadřazených signálních drah (Skovbro et al., 2008).

DAG jsou důležitými meziprodukty metabolismu fosfolipidů i triacylglycerolů. Navíc fungují v buněčné signalizaci jako „druhý posel“. Vznikají štěpením fosfolipidů nebo *de novo* syntézou ze dvou molekul LCFA-CoA. Jejich působení je spojeno se zhoršením inzulínové citlivosti v myocytu. Většina výzkumů potvrdila, že se zvýšenou hladinou DAG v myocytu je spojena i aktivace izoformy  $\theta$  protein kinázy C (PKC $\theta$ ). PKC $\theta$  je serinová kináza, která fosforyluje IRS1 na Ser<sup>307</sup>. Serinová fosforylace IRS1 ruší inzulínovou signalizaci a znemožní další přenos signálu. V důsledku serinové fosforylace IRS1 bylo prokázáno 30% snížení tyrosinové fosforylace IRS1 a 50% snížení aktivity PI3K (Yu et al., 2002).

U diabetických pacientů byla prokázána zvýšená hladina i aktivita PKC $\theta$  v porovnání s nediabetickými jedinci (Itani et al., 2001). Tyto poznatky potvrzují významnou úlohu, jakou reaktivní meziprodukty lipidového metabolismu hrají v rozvoji inzulínové rezistence.

LCFA-CoA jsou metabolicky aktivní formou mastných kyselin. Ukázalo se, že množství LCFA-CoA ve svalu je lepším ukazatelem inzulínové rezistence než TAG. Zvýšená hladina LCFA-CoA spojená s inzulínovou rezistencí byla zjištěna ve vzorcích z kosterního svalu jedinců na dietě s vysokým obsahem tuku (Ellis et al., 2000). Nebylo objasněno, jak přesně LCFA-CoA interferují s inzulínovou signalizací. Potenciální mechanismus mohou naznačovat zvýšené hladiny LCFA-CoA v myocytech zároveň s aktivací izoforem PKC (Yu et al., 2002). LCFA-CoA jsou prekursorů ceramidů i DAG, a tak je možné, že na inzulínovou signalizaci působí nepřímo.

TNF $\alpha$  je zánětlivý cytokin sekretovaný tukovou tkání a u obézních jedinců i kosterním svalstvem. Dlouhodobě zvýšené hladiny TNF $\alpha$  u hlodavců indukovaly inzulínovou rezistenci (Lang et al., 1992). *In vivo* infuze TNF $\alpha$  zhoršila utilizaci glukózy v kosterních svalech potkanů (Zhang et al., 2003). V buněčné kultuře potkaních myocytů bylo prokázáno, že TNF $\alpha$  inhibuje translokaci GLUT4 přenašečů na plazmatickou membránu a aktivuje serin/threoninové kinázy, které se na inhibici translokace GLUT4 mohou podílet. Bylo prokázáno, že působením TNF $\alpha$  *in vitro* došlo v myocytu k aktivaci p38 MAPK, c-Jun N-terminální kinázy (JNK) a kinázy inhibitoru  $\kappa$ B (IKK). Tyto kinázy mohou fosforylovat Ser<sup>307</sup> na IRS1 a snížit tak efektivitu přenosu inzulínového signálu (de Alvaro et al., 2004). Při inkubaci izolovaného svalu v mediu obsahujícím TNF $\alpha$ , ale žádné efekty pozorovány nebyly. Je možné, že účinky TNF $\alpha$  jsou zprostředkovány také inhibicí účinků inzulínu na krevní řečiště. Inzulín stimuluje vazodilataci cév a umožní vyšší přítok nutrientů a mezi nimi i glukózy k buňkám. TNF $\alpha$  tento efekt ruší, a tím limituje přítok glukózy. To je možná příčina, proč efekt TNF $\alpha$  nebyl v izolovaném svalu pozorován (Zhang et al., 2003).



**Obr.7 : Vliv mastných kyselin a jejich metabolitů na inzulinovou signalizaci**

(převzato a upraveno z Consitt et al., 2009)

Mastné kyseliny vstupují do myocyty jsou buď metabolizovány v mitochondriích nebo jsou z nich syntetizovány TAG a jiné metabolity. Tyto metabolity ruší inzulinovou signální kaskádu na aktivaci kináz provádějících inhibiční serinovou fosforylaci na IRS1 nebo přímo působením na Akt/PKB. Také prozánětlivý cytokin TNF $\alpha$  na myocyt působí. Aktivuje další kinázy, které IRS1 inhibičně fosforylují a znemožní přenos inzulinového signálu.

## 7.2. Dieta s vysokým obsahem cukrů

Nejen nadměrný příjem tuků, ale i cukrů zhoršuje inzulinovou citlivost a metabolismus. Záleží jak na množství, tak délce podávání nadměrného množství sacharidů. Podávání zvýšeného množství kukuřičného škrobu i sacharózy vedlo u potkanů k nárůstu viscerálního tukového depa a inzulinové rezistence v podobném rozsahu jako u tukem indukované inzulinové rezistence. Zvířata krmená sacharózovou dietou vykazovala nižší inzulinovou citlivost než zvířata krmená dietou s vyšším obsahem škrobů. Tento efekt se ale vyskytoval jen u samců, u samic nikoli. Na zhoršení inzulinové citlivosti u samců se pravděpodobně podílí i humorální faktory. Dieta s vysokým podílem sacharózy indukovala sníženou inzulinovou citlivost periferních tkání k inzulinu a rezistenci jater k inzulinovému signálu pro utlumení produkce glukózy. Kosterní sval jedinců krmených vysokosacharózovou dietou vykazoval zhoršenou utilizaci glukózy. Na rozdíl od vysokotuké diety nebyl po vysokocukerné dietě prokázán zvýšený obsah TAG v kosterním svalu (Kim et al., 1999).



Chicco a kolegové prokázali, že ve svazech potkanů krmených vysokosacharózovou dietou se vyskytuje zvýšené množství TAG i LCFA-CoA. Tato různá pozorování byla pravděpodobně zapříčiněna odlišnou dobou podávání diety. V experimentu byly rovněž prokázány zvýšené hladiny TAG a volných mastných kyselin v plazmě těchto potkanů (Chicco et al., 2003).

Stejně jako u inzulín-rezistentních potkanů, kterým byla podávána vysokotuká dieta, i u potkanů krmených vysokosacharózovou dietou byla prokázána snížená funkce mitochondrií. U těchto potkanů byla prokázána snížená aktivita elektron-transportního řetězce i kapacita oxidační fosforylace (Chanseume et al., 2006).

## 8. Ovlivnění inzulínové rezistence v kosterním svalu

### 8.1 Kalorická restrikce

Snížení příjmu energie má u diabetiků benefiční účinky. V první řadě působí nepřímo, tedy že dojde ke zmenšení tukové tkáně, hlavně ve viscerální oblasti, a vylepšení metabolického profilu. Přímě působí na myocyty tím, že spouští specifické signalizace vedoucí k vylepšení inzulínové citlivosti.

Přímý vliv kalorické restrikce na myocyty bylo dokázáno v experimentech na Goto-Kakizaki kmenu potkana, který vykazuje silnou inzulínovou rezistenci a není obezní. Kalorická restrikce u těchto zvířecích modelů snížila zánětlivou reakci ve svalu, zvýšila glukózovou toleranci, snížila inzulínovou rezistenci, snížila hladinu volných mastných kyselin v plazmě a vylepšila plazmatické hladiny adipokinů. Adiponektin má antidiabetické účinky, stimuluje utilizaci glukózy v kosterním svalu a působí protizánětlivě. Po kalorické restrikci se zvýšila hladina adiponektinu jak u inzulín-rezistentních, tak zdravých potkanů. Omezení příjmu potravy vedlo ke snížení hladiny obou zánětlivých cytokinů – IL-6 a TNF $\alpha$  v plazmě. Tato pozorování pravděpodobně měla spojitost se zlepšením inzulínové citlivosti a zvýšením hladin adiponektinu v plazmě. Výsledky prokázaly, že po snížení příjmu potravy diabetických potkanů se snížil poměr aktivní formy JNK, kinázy, která inhibičně fosforyluje IRS1 a narušuje inzulínovou signalizaci. To může mít souvislost se snížením hladin volných mastných kyselin v plazmě a snížením TNF $\alpha$  ve svalové tkáni. Také bylo prokázáno zvýšení mitochondriální biogeneze a oxidace mastných kyselin (Crisóstomo et al., 2010).

V posledních letech je věnována pozornost také savčímu analogu *Sir2* – sirtuinu 1 (Sirt1), který patří mezi NAD<sup>+</sup> dependentní deacetylázy. Významným efektem snížení příjmu energie v potravě je prodloužení života a právě sirtuiny jsou klíčové pro zprostředkování tohoto účinku. Sirt1 je při kalorické restrikci aktivní v důsledku zvýšení NAD<sup>+</sup> ve svalu.

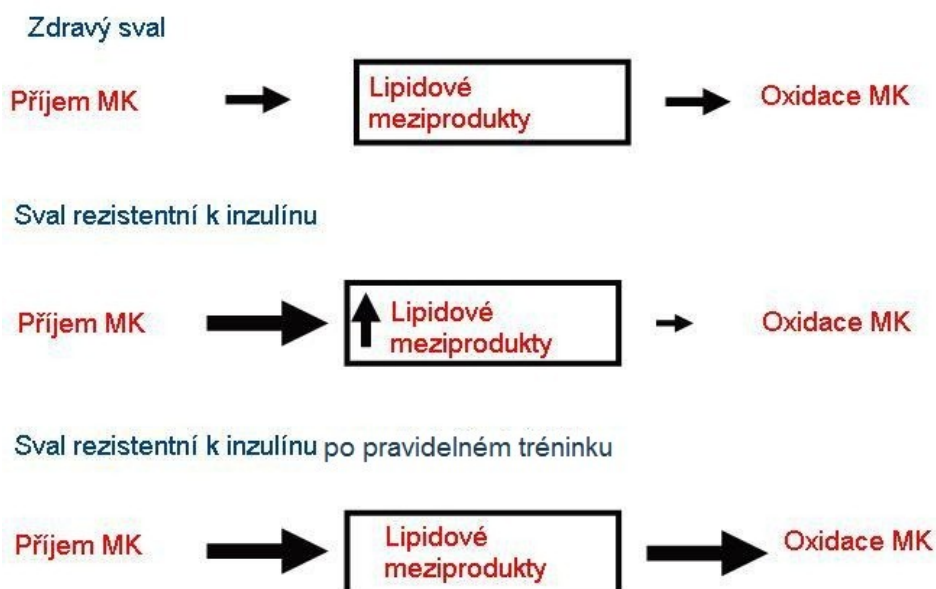
Bylo prokázáno, že po 20 dnech snížení energetického příjmu o 40% oproti normálu se zvýšila citlivost k inzulínu i míra signalizace přes PI3K při stimulaci inzulínem. Mechanismus působení je pravděpodobně zprostředkován deacetylací genu pro přenašeč signálu a aktivátoru transkripce (*Stat3*), který ovládá transkripci regulačních podjednotek p55 $\alpha$ /p50 $\alpha$  PI3K. Deacetylací je transkripce genu umlčena. Bylo prokázáno, že pokud se nefunkční monomerní regulační podjednotky PI3K navážou na IRS1, inhibují přenos inzulínového signálu. Snížením exprese těchto monomerů není inzulínová signalizace inhibována a je umožněna efektivnější utilizace glukózy po inzulínové stimulaci (Schenk et al., 2011). Kalorická restrikce je důležitou součástí léčby inzulínové rezistence a její příznivé účinky mají nezanedbatelnou roli v prevenci i zpoždění nástupu komplikací, jako například rozvoje T2DM.

## 8.2.Fyzická aktivita

Fyzická aktivita je považována za klíčovou součást léčby pacientů s obezitou nebo T2DM většinou spolu s mírnou kalorickou restrikcí. Nejenže při fyzické aktivitě dochází ke snížení hmotnosti a spalování tuků, ale samotná fyzická aktivita na kosterní svalstvo působí pozitivně. Dojde ke zvýšení oxidační kapacity mastných kyselin v mitochondriích, zlepší se inzulínová citlivost a utilizace glukózy. U pacientů s T2DM byla prokázána snížená kapacita oxidace mastných kyselin v mitochondriích. Cvičení stimuluje zvýšení oxidační kapacity mitochondrií v kosterním svalu prostřednictvím zvýšení aktivity enzymů citrátového cyklu, elektron-transportního řetězce a  $\beta$  oxidace (Obrázek 8).

Fyzická aktivita vede ke snížení tělesné hmotnosti a snížení objemu tukové tkáně, které s sebou také přináší zvýšení inzulínové citlivosti. U pacientů, kteří podstoupili čtyřměsíční tréninkový program bylo snížení hmotnosti doprovázeno zlepšením inzulínové citlivosti. Také u nich bylo naměřeno zvýšení aktivity enzymů oxidační fosforylace (Menshikova et al., 2005). Snížená schopnost oxidace mastných kyselin v kosterním svalu a zvýšená míra transportu mastných kyselin do buňky u pacientů s inzulínovou rezistencí vede k akumulaci tuků a jejich metabolitů uvnitř (Obrázek 8). Zdá se paradoxní, že celkový podíl tuků ve svalové tkáni je vysoký u trénovaných sportovců vykazujících vysokou inzulínovou citlivost. Výsledky ale ukazují, že cvičení podporuje syntézu stabilních triacylglycerolů a snižuje podíl syntézy reaktivních metabolitů, jako ceramidů a DAG. Tyto metabolity interferují s inzulínovou signalizací více než triacylglyceroly (Bruce et al., 2006).

Dalším parametrem, který se po cvičení zlepšuje, je utilizace glukózy. K translokaci GLUT4 přenašečů na membránu dochází díky aktivaci AMPK. Kináza je aktivována AMP, který vzniká hydrolýzou ATP v pracujícím svalu. AMPK stejně jako Akt/PKB fosforyluje a inhibuje GAP doménu na proteinu AS160 a umožní translokaci váčků na membránu (Kramer et al., 2006). Aktivace AMPK také zvyšuje expresi transkripčního faktoru PGC1 $\alpha$ . Bylo zjištěno, že PGC1 $\alpha$  po cvičení zvyšuje expresi genů mitochondriální oxidace mastných kyselin a mitochondriální biogeneze (Pilegarrrd et al., 2003). AMPK aktivovaná cvičením také nepřímo zvyšuje míru oxidace mastných kyselin. AMPK inhibičně fosforyluje ACC, která katalyzuje vznik malonyl-CoA a aktivuje enzym, který malonyl-CoA degraduje. Pokles hladiny malonyl-CoA umožní aktivaci CPT1, přenos aktivovaných mastných kyselin přes membránu mitochondrií a jejich oxidaci (Roepstorff et al., 2005).



**Obr.8 : Schéma poměrů mezi příjmem a oxidací mastných kyselin ve svalu zdravém, inzulin-rezistentním a inzulin-rezistentním po fyzické aktivitě.**

(přepřacováno z Turcotte a Fisher, 2008)

*Zdravý sval mastné kyseliny, které přijme, dokáže odbourat. Nedochází tak k hromadění lipidů a lipidových meziproduktů v myocytech. V případě inzulin-rezistentního svalu je příjem mastných kyselin zvýšen a schopnost oxidace mastných kyselin naopak snížena. To vede k hromadění metabolitů ve svalu a necitlivosti k inzulinu. Pokud inzulin-rezistentní sval pravidelně pracuje, zvýší se oxidace mastných kyselin a poměr příjem/degradace mastných kyselin se vyrovná. Nedochází tak k hromadění lipidových metabolitů ve svalu.*

### 8.3. Farmakologická léčba

Cílem léčby T2DM je zlepšení inzulínové citlivosti periferních tkání. K tomu se používají léky různého chemického složení, které fungují rozdílnými mechanismy.

Jsou to preparáty na bázi sulfonylureázy, biguanidy a thiazolidindiony. Sulfonylureáza zvyšuje sekreci inzulínu z  $\beta$ -buněk pankreatu.

Nejčastěji používaným biguanidem je metformin. Ačkoli je používán už 50 let, přesný mechanismus působení metforminu není zcela známý. Metformin snižuje glykémii nalačno inhibicí jaterní produkce glukózy. Zvyšuje oxidaci mastných kyselin a inzulínovou citlivost periferních tkání. Metformin v kosterním svalu aktivuje AMPK, která inhibuje proteinový komplex mTORC2, zmíněný v kapitole o vlivu inzulínu na syntézu proteinů. Inhibicí mTORC2 jsou pozastaveny procesy, které komplex ovládá: syntéza proteinů, autofagie a buněčný růst (Andújar-Plata et al., 2012). Léčba metforminem zvyšuje aktivitu hexokinázy, citrát syntázy a  $\beta$ -HAD, klíčových enzymů glykolýzy, citrátového cyklu a katabolizmu lipidů (Suwa et al., 2006). V experimentech *in vitro* na lidských myotubech byla prokázána zvýšená exprese GLUT4 přenašečů po 8-denní metforminové terapii (Al-Khalili et al., 2005), u experimentu *in vivo* po 14 dnech působení metforminu, ale prokázána nebyla (Suwa et al., 2006). Zatím nebylo objasněno, jaké mechanismy mohou *in vivo* bránit expresi GLUT4 přenašečů. Metformin může u pacientů s inzulínovou rezistencí zpomalit rozvoj T2DM. Ve studii „Diabetes prevention program“ byli pacienti s IR rozděleni do 3 skupin. Jedné skupině byl podáván metformin, další placebo a třetí změnila životní styl. Skupiny byly sledovány 3 roky. U skupiny, která změnila životní styl, byla incidence diabetu po třech letech o 58% nižší než u kontrolní skupiny dostávající placebo a u skupiny léčené metforminem o 31%. Nebylo prokázáno, jestli metformin dokáže působit preventivně, nebo je jeho prospěšný vliv zprostředkován jeho schopností snižovat glykémii a tím zpomalit rozvoj nemoci (Knowler et al., 2002). Kromě příznivého působení na inzulínovou citlivost je metformin oblíben především pro minimum vedlejších účinků.

Další možností v léčbě inzulínové rezistence je použití syntetických ligandů receptorů aktivovaných proliferátory peroxisomů (PPAR). PPAR jsou jaderné receptory aktivované mastnými kyselinami nebo eikosanidy. Aktivace PPAR vede k formaci heterodimerů s jadernými retinoid-X-receptory. Tyto heterodimery nasedají na specifické sekvence DNA a spouští transkripci cílových genů. Existují 3 izoformy PPAR. Agonisté PPAR se jmenují thiazolidindiony (TZD, glitazony) a jsou agonisty hlavně izoformy PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$  jsou exprimovány v tukové tkáni i v kosterním svalu. Uplatňuje se zde silně i nepřímý vliv na kosterní sval (Staels a Fruchart, 2005).

TZD stimulují diferenciaci adipocytů, utilizaci mastných kyselin a podporují ukládání tuků v subkutánních ložiscích na úkor ukládání do viscerálního tukového depa. TZD stimulují sekreci adiponektinu z tukové tkáně. Adiponektin snižuje sekreci TNF $\alpha$  makofágy a tím působí protizánětlivě (Maeda et al., 2001). Zdá se, že aktivace PPAR $\gamma$  rosiglitazonem v kosterním svalu zvyšuje expresi a translokaci glukózových přenašečů GLUT1 na plazmatickou membránu a tím zlepší utilizaci glukózy (Kramer et al., 2001). Za těchto okolností dojde ke snížení hladiny volných mastných kyselin v plazmě a zlepšení inzulinové citlivosti. Na rozdíl od metforminu mají TZD mají některé vážné vedlejší účinky. Všechny léky patřící do skupiny TZD způsobují: nárůst hmotnosti, edémy, kardiovaskulární komplikace a zvýšené hladiny lipoproteinů. Například troglitazon u některých pacientů vyvolával závažné poškození jater a musel být stažen z trhu. I přesto jsou TZD často předepisovány a jsou vyvíjeny nové druhy (Staels a Fruchart, 2005).

Nejnovějším přípravkem z řady TZD je preparát mitoglitazon, který právě prochází druhou fází klinických testů. Mitoglitazon je tzv. PPAR $\gamma$  šetrný TZD (psTZD). Při farmakologických dávkách neaktivuje jaderné receptory PPAR $\gamma$  a změny v metabolismu zprostředkovává působením na cílová místa v mitochondriích mTOT. Mitoglitazon v tukové tkáni spouští diferenciaci adipocytů na hnědou tukovou tkáň, zvýšenou expresi odpráhujícího proteinu 1 (UCP1) a podporuje oxidaci mastných kyselin. Snižuje hladinu glukózy a inzulinu v plazmě a zvyšuje inzulinovou citlivost. Silný potenciál mitoglitazonu stát se novým lékem na T2DM, inzulinovou rezistenci spočívá v tom, že nemá závažné vedlejší účinky jako ostatní TZD (otoky a nárůst váhy, kardiovaskulární komplikace) (McDonald et al., 2011).

#### **8.4. Benefiční účinky n-3 PUFA**

Nejen množství, ale i druh tuků přijímaných v potravě hraje zásadní roli při rozvoji metabolického syndromu. U populací konzumujících velké množství tučných mořských ryb byla prevalence T2DM mnohem nižší než u ostatních skupin obyvatel (Kagawa et al., 1982). Bylo zjištěno, že nenasycené mastné kyseliny řady n-3 (n-3 PUFA), zejména kyseliny eikosapentaenová (EPA, 20:5n-3) a dokosaheptaenová (DHA, 22:6n-3), jsou zodpovědné za příznivé účinky na metabolismus. Příjem n-3 PUFA v potravě snižuje rizika kardiovaskulárních onemocnění, působí protizánětlivě a mají významný antiobezogenní efekt. Podávání n-3 PUFA vedlo u lidí i pokusných zvířat ke snížení hladiny TAG a celkového cholesterolu v krvi a zvýšení hladiny lipoproteinu s vysokou hustotou - HDL cholesterolu. Zvýšila se také sekrece adiponektinu z tukové tkáně a citlivost periferních tkání k inzulinu (včetně kosterního svalu); (Tishinsky et al., 2012).

n-3 PUFA zvyšují inzulínovou citlivost kosterního svalu nepřímo - zvýšením sekrece adiponektinu, ale i přímým působením. Aktivují AMPK, enzym podporující utilizaci glukózy zvýšením translokace GLUT4 váčků na membránu. AMPK také zvyšuje oxidaci mastných kyselin (Lam et al., 2011). Lipidové složení plazmatické membrány je ovlivněno charakterem lipidů přijímaných v potravě. Přidáním n-3 PUFA do potravy se zvýšil podíl nenasycených mastných kyselin ve fosfolipidech sarkolemy – plazmatické membrány svalových buněk. Vyšší podíl nenasycených mastných kyselin zvýšil fluiditu membrány buněk kosterního svalstva. S vyšší fluiditou membrány se zvýšil i počet inzulínových receptorů a inzulínová signalizace (Martín de Santa Olalla et al., 2009). n-3 PUFA mají prokázaný preventivní potenciál. Podávání n-3 PUFA dokáže zabránit zhoršení inzulínem stimulované utilizaci glukózy, při příjmu vysokého množství nasycených mastných kyselin. Podávání vyššího množství rybího oleje po 4 týdny dokonce dokázalo zvrátit již zhoršenou utilizaci glukózy po inzulínové stimulaci. Už nastavená celotělová inzulínová rezistence ale nemůže být suplementací n-3 PUFA zvrácena (Tishinsky et al., 2012).

Bylo prokázáno, že EPA a DHA inhibují expresi *Scd1* mRNA. Stearoyl-CoA desaturáza (SCD1) je enzym přeměňující nasycené mastné kyseliny na mononenasycené mastné kyseliny. Snížená aktivita a míra exprese enzymu SCD1 vede ke zvýšení míry oxidace mastných kyselin, zvýšení inzulínové citlivosti a snížení akumulace lipidů v kosterním svalu. Inhibice SCD1 vede k utlumení lipogeneze a zvýšené utilizaci glukózy (Poudyal a Brown, 2011). EPA zvyšuje příjem glukózy a mastných kyselin přes plazmatickou membránu. Byla prokázána zvýšená exprese FAT/CD36 a GLUT1 přenašečů *in vitro* na lidských myocytech a také zvýšená syntéza TAG (Aas et al., 2006). Některé jiné studie ale benefiční účinky n-3 PUFA u pacientů neprokázaly (Mostad et al., 2006).

## 8.5 Kombinovaná léčba

Bylo prokázáno, že mírné zvýšení energetického výdeje (např. rychlou chůzí), spolu s mírným snížením příjmu energie (asi 450 kcal) je efektivnější v prevenci nebo zpomalení rozvoje inzulínové rezistence a T2DM než farmakologická léčba. Inzulínová citlivost se zvyšuje v řádu hodin po cvičení u zdravých lidí i pacientů s inzulínovou rezistencí a T2DM na mírné kalorické restrikcí. Po několika dnech bez cvičení se ale citlivost k inzulínu ve svalu opět zhoršuje (Cartee et al., 1989).

V minulých letech byla testována kombinace n-3 PUFA spolu s nízkými dávkami TZD. Působení této kombinace vykazovalo příznivější účinky než působení samotných n-3 PUFA. Došlo k dalšímu zlepšení glukózové tolerance, snížení hladiny volných mastných kyselin a zánětu v tukové tkáni. Kombinace také indukovala další sekreci adiponektinu z tukové tkáně a snížení velikosti adipocytů. Kombinace zlepšila inzulínem stimulovanou syntézu glykogenu v kosterním svalu. Díky vzájemnému příznivému působení TZD a n-3 PUFA i při nízkých dávkách TZD, byly eliminovány nežádoucí účinky TZD. To je významným poznatkem pro další výzkum a potenciální použití v léčbě T2DM a inzulínové rezistence (Kuda et al., 2009)

## 9. Závěr

Vysoký příjem potravy spolu s nedostatečnou fyzickou aktivitou vedou k rozvoji obezity a změnám metabolismu na celotělové, orgánové i buněčné úrovni. Dochází k rozvoji inzulínové rezistence, kdy tkáně nejsou schopny reagovat na inzulínovou signalizaci.

Kosterní sval je tkáň, která se, vedle jater a tukové tkáně, významně podílí na energetickém metabolismu jedince. Po inzulínovém stimulu využívá až 80% glukózy z plazmy a ukládá ji ve formě glykogenu. Jelikož se kosterní sval podílí na využití glukózy v tak velké míře, je důležité důkladně porozumět faktorům, které se na navození inzulínové rezistence podílí a mechanismům, jakým rezistenci navozují. To umožní cílený vývoj léčiv na základě prokázaných mechanismů poškození inzulínové signalizace a sacharidového a lipidového metabolismu. V současné době je zájem zaměřen na vliv n-3 nenasycených mastných kyselin na inzulínovou citlivost a jejich schopnost citlivost k inzulínu zlepšit. Jsou vyvíjena i nová léčiva, zlepšující celkovou inzulínovou citlivost bez významných vedlejších účinků. Ačkoli je většina studií zaměřena na vliv diety s vysokým obsahem lipidů na rozvoj inzulínové rezistence v kosterním svalu, tak současné poznatky naznačují i značný vliv potravy s vysokým podílem sacharózy.



## **Přehled použité literatury:**

- Aas V, Rokling-Andersen MH, Kase ET, Thoresen GH, Rustan AC. 2006.** Eicosapentaenoic acid (20:5 n-3) increases fatty acid and glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells. *J Lipid Res* **47**: 366-374.
- Adams JM 2nd, Pratipanawatr T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC, Mandarin LJ. 2004.** Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* **53**: 25-31.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. 1997.** Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Biochim Biophys Acta* **7**: 261-269.
- Al-Khalili L, Forsgren M, Kannisto K, Zierath JR, Lönnqvist F, Krook A. 2005.** Enhanced insulin-stimulated glycogen synthesis in response to insulin, metformin or rosiglitazone is associated with increased mRNA expression of GLUT4 and peroxisomal proliferator activator receptor gamma co-activator 1. *Diabetologia* **48**: 1173-1179.
- Andújar-Plata P, Pi-Sunyer X, Laferrère B. 2012.** Metformin effects revisited. *Diabetes Res Clin Pract* **95**: 1-9.
- Brady MJ, Saltiel AR. 2001.** The role of protein phosphatase-1 in insulin action. *Recent Prog Horm Res* **56**: 157-173.
- Bruce CR, Brolin C, Turner N, Cleasby ME, Van der Leij F, Cooney GJ, Kraegen EW. 2006.** Overexpression of carnitine palmitoyltransferase I in skeletal muscle in vivo increases fatty acid oxidation and reduces triacylglycerol esterification. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**: 1231-1237.
- Buhl ES, Jessen N, Schmitz O, Pedersen SB, Pedersen O, Holman GD, AND S, and Lund. 2001.** Chronic treatment with 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside increases insulin-stimulated glucose uptake and GLUT4 translocation in rat skeletal muscles in a ?ber type-specific manner. *Diabetes* **50**: 12-17.
- Carey AL, Bruce CR, Sacchetti M, Anderson MJ, Olsen DB, Saltin B, Hawley JA, Febbraio MA. 2004.** Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha are not increased in patients with Type 2 diabetes: evidence that plasma interleukin-6 is related to fat mass and not insulin responsiveness. *Diabetologia* **47**: 1029-1037.
- Cartee GD, Young DA, Sleeper MD, Zierath J, Wallberg-Henriksson H, Holloszy JO. 1989.** Prolonged increase in insulin-stimulated glucose transport in muscle after exercise. *Am J Physiol* **256**: 494-495.
- Consitt LA, Bell JA, Hudson JA. 2009.** Intramuscular Lipid Metabolism, Insulin Action and Obesity. *IUBMB Life* **61**: 47-55.
- Corpeleijn E, Saris WH, Blaak EE. 2009.** Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle. *Obes Rev* **10**: 178-193
- Crisóstomo J, Rodrigues L, Matafome P, Amaral C, Nunes E, Louro T, Monteiro P, Seica R. 2010.** Beneficial effects of dietary restriction in type 2 diabetic rats: the role of adipokines and insulin resistance. *Br J Nutr* **104**: 76-82.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. 1995.** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**: 785-789.

- Cross DA, Watt PW, Shaw M, van der Kaay J, Downes CP, Holder JC, Cohen P. 1997.** Insulin activates protein kinase B, inhibits glycogen synthase kinase-3 and activates glycogen synthase by rapamycin-insensitive pathways in skeletal muscle and adipose tissue. *FEBS Lett* **406**: 211-215.
- De Alvaro C, Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. 2004.** Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J Biol Chem* **279**: 17070-17078.
- Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. 2011.** Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract* **93**: S52-59.
- Ellis BA, Poynten A, Lowy AJ, Furler SM, Chisholm DJ, Kraegen EW, Cooney GJ. 2000.** Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**: 554-560.
- Grinton S, Powers SK, Lawler J, Criswell D, Dodd S, Edwards W. 1992.** Endurance training-induced increases in expiratory muscle oxidative capacity. *Med Sci Sports Exerc.* **24**: 551-555.
- Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. 2005.** Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* **87**: 99-109.
- Hinault C, Mothe-Satney I, Gautier N, Lawrence JC Jr, Van Obberghen E. 2004.** Amino acids and leucine allow insulin activation of the PKB/mTOR pathway in normal adipocytes treated with wortmannin and in adipocytes from db/db mice. *FASEB J* **18**: 1894-1896.
- Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, Narra K, Hoehn KL, Knotts TA, Siesky A, Nelson DH, Karathanasis SK, Fontenot GK, Birnbaum MJ, Summers SA. 2007.** Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* **5**: 167-179.
- Holz GG, Habener JF. 1992.** Signal transduction crosstalk in the endocrine system: pancreatic beta-cells and the glucose competence concept. *Trends Biochem Sci* **17**: 388-393.
- Chanseume E, Malpuech-Brugère C, Patrac V, Bielicki G, Rousset P, Couturier K, Salles J, Renou JP, Boirie Y, Morio B. 2006.** Diets high in sugar, fat, and energy induce muscle type-specific adaptations in mitochondrial functions in rats. *J Nutr* **136**: 2194-2200.
- Chicco A, D'Alessandro ME, Karabatas L, Pastorale C, Basabe JC, Lombardo YB. 2003.** Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. *J Nutr.* **133**: 127-133.
- Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, Toker A. 1998.** Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol* **8**: 1069-1077.
- Itani SI, Pories WJ, Macdonald KG, Dohm GL. 2001.** Increased protein kinase C theta in skeletal muscle of diabetic patients. *Metabolism* **50**: 553-557.
- Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. 2002.** Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* **51**: 2944-2950.
- Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA. 2000.** Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**: 1039-1044.
- Kim JY, Nolte LA, Hansen PA, Han DH, Kawanaka K, Holloszy JO. 1999.** Insulin resistance of muscle glucose transport in male and female rats fed a high-sucrose diet. *Am J Physiol* **276**: 665-672.

- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM; Diabetes Prevention Program Research Group. 2002.** Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* **346**: 393-403.
- Kraegen EW, Bruce C, Hegarty BD, Ye JM, Turner N, Cooney G. 2009.** AMP-activated protein kinase and muscle insulin resistance. *Front Biosci.* **14**: 4658-72
- Kramer D, Shapiro R, Adler A, Bush E, Rondinone CM. 2001.** Insulin-sensitizing effect of rosiglitazone (BRL-49653) by regulation of glucose transporters in muscle and fat of Zucker rats. *Metabolism* **50**: 1294-1300.
- Kramer HF, Witzak CA, Taylor EB, Fujii N, Hirshman MF, Goodyear LJ. 2006.** AS160 regulates insulin- and contraction-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle. *J Biol Chem* **281**: 31478-31485.
- Krssak M, Petersen KF, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, Roden M, Shulman GI. 1999.** Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a <sup>1</sup>H NMR spectroscopy study. *Diabetologia* **42**: 113-116.
- Kuda O, Jelenik T, Jilkova Z, Flachs P, Rossmeisl M, Hensler M, Kazdova L, Ogston N, Baranowski M, Gorski J, Janovska P, Kus V, Polak J, Mohamed-Ali V, Burcelin R, Cinti S, Bryhn M, Kopecky J. 2009.** n-3 Fatty acids and rosiglitazone improve insulin sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice fed a high-fat diet *Diabetologia* **52**: 1455-1455.
- Lam YY, Hatzinikolas G, Weir JM, Janovská A, McAinch AJ, Game P, Meikle PJ, Wittert GA. 2011.** Insulin-stimulated glucose uptake and pathways regulating energy metabolism in skeletal muscle cells: the effects of subcutaneous and visceral fat, and long-chain saturated, n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* **1811**: 468-475.
- Lang CH, Dobrescu C, Bagby GJ. 1992.** Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology* **130**: 43-52.
- Lawlor MA, Alessi DR. 2001.** PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* **114**: 2903-2910.
- Lombardo YB, Hein G, Chicco A. 2007.** Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. *Lipids* **42**: 427-437.
- Luiken JFP, Coort SLM, Willems J, Coumans WA, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatzl JFC. 2003.** Contraction-Induced Fatty Acid Translocase/CD36 Translocation in Rat Cardiac Myocytes Is Mediated Through AMP-Activated Protein Kinase Signaling. *Diabetes* **52**: 1627-1634.
- Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y. 2001.** PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* **50**: 2094-2099.
- Martín de Santa Olalla L, Sánchez Muniz FJ, Vaquero MP. 2009.** N-3 fatty acids in glucose metabolism and insulin sensitivity. *Nutr Hosp* **24**: 113-127.
- McDonald GW, Cole SL, Holewa DD, Brightwell-Conrad AS, Colca JR, Kletzien RF. 2011.** Novel Insulin Sensitizers Enhance Brown Adipose Cell Differentiation by Modulation of the Wnt Signaling Pathway. *Metabolic Solutions Development Company*.
- Menshikova EV, Ritov VB, Toledo FG, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. 2005.** Effects of weight loss and physical activity on skeletal muscle mitochondrial function in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**: 818-825.

- Mihaylova MM, Shaw RJ. 2011.** The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* **13**: 1016-1023.
- Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Müller C, Carling D, Kahn BB. 2002.** Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* **415**: 339-343.
- Mostad IL, Bjerve KS, Bjorgaas MR, Lydersen S, Grill V. 2006.** Effects of n-3 fatty acids in subjects with type 2 diabetes: reduction of insulin sensitivity and time-dependent alteration from carbohydrate to fat oxidation. *Am J Clin Nutr* **84**: 540-550.
- Navé BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR. 1999.** Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J*. **344**: 427-431.
- Pessin JE, Thurmond DC, Elmendorf JS, Coker JK, Okada S. 1999.** Molecular Basis of Insulin-stimulated GLUT4 VesicleTrafficking. *LOCATION! LOCATION! LOCATION!* **274**: 2593-2596.
- Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. 2004.** Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* **350**: 664-671.
- Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD. 2003.** Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 $\alpha$  gene in human skeletal muscle. *J Physiol* **546**: 851-858.
- Poudyal H, Brown L. 2011.** Stearoyl-CoA desaturase: a vital checkpoint in the development and progression of obesity. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **11**: 217-231.
- Proud CG. 2006.** Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochem Soc Trans* **34**: 213-216.
- Rasmussen BB, Holmback UC, Volpi E, Morio-Liondore B, Paddon-Jones D, Wolfe RR. 2002.** Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle. *J Clin Invest* **110**: 1687-1693.
- Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. 2005.** Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* **54**: 8-14.
- Roepstorff C, Helge JW, Vistisen B, Kiens B. 2004.** Studies of plasma membrane fatty acid-binding protein and other lipid-binding proteins in human skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* **63**: 239-244.
- Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA. 1996.** The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* **97**: 1111-1116.
- Sano H, Kane S, Sano E, Mfinea CP, Asara JM, Lane WS, Garner CW, Lienhard GE. 2003.** Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem* **278**: 14599-14602.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. 2005.** Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**: 1098-1101.
- Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. 2007.** Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev* **87**: 507-520.
- Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, Shulman RG. 1990.** Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N Engl J Med* **322**: 223-228.
- Schenk S, Horowitz JF. 2007.** Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* **117**: 1690-1698.
- Schenk S, McCurdy CE, Philp A, Chen MZ, Holliday MJ, Bandyopadhyay GK, Osborn O, Baar K, Olefsky JM. 2011.** Sirt1 enhances skeletal muscle insulin sensitivity in mice during caloric restriction. *J Clin Invest* **121**: 4281-4288.

- Simoneau JA, VeerkJH, Turcotte LP, Kelley DE. 1999.** Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB J* **13**: 2051-2060.
- Skovbro M, Baranowski M, Skov-Jensen C, Flint A, Dela F, Gorski J, Helge JW. 2008.** Human skeletal muscle ceramide content is not a major factor in muscle insulin sensitivity. *Diabetologia* **51**: 1253-1260.
- Staels B, Fruchart JC. 2005.** Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes* **54**: 2460-2470.
- Sun XJ, Crimmins DL, Myers MG Jr, Miralpeix M, White MF. 1993.** Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol* **13**: 7418-7428.
- Suwa M, Egashira T, Nakano H, Sasaki H, Kumagai S. 2006.** Metformin increases the PGC-1alpha protein and oxidative enzyme activities possibly via AMPK phosphorylation in skeletal muscle in vivo. *J Appl Physiol* **101**: 1685-1692.
- Timmerman KL, Lee JL, Dreyer HC, Dhanani S, Glynn EL, Fry CS, Drummond MJ, Sheffield-Moore M, Rasmussen BB, Volpi E. 2010.** Insulin stimulates human skeletal muscle protein synthesis via an indirect mechanism involving endothelial-dependent vasodilation and mammalian target of rapamycin complex 1 signaling. *J Clin Endocrinol Metab* **95**: 3848-3857.
- Tishinsky JM, Gulli RA, Mullen KL, Dyck DJ, Robinson LE. 2012.** Fish oil prevents high-saturated fat diet-induced impairments in adiponectin and insulin response in rodent soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **302**: 598-605.
- Torres SH, De Sanctis JB, de L Briceño M, Hernández N, Finol HJ. 2004.** Inflammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *J Endocrinol* **181**: 419-127.
- Turcotte LP, Fisher JS. 2008.** Skeletal muscle insulin resistance: roles of fatty acid metabolism and exercise. *Phys Ther* **88**:1279-1296
- Van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. 2011.** Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* **91**: 79-118.
- Van den Berghe G. 2004.** How does blood glucose control with insulin save lives in intensive care? *J Clin Invest* **114**: 1187-1195
- Van Obberghen E, Ballotti R, Gazzano H, Fehlmann M, Rossi B, Gammeltoft S, Debant A, Le Marchand-Brustel Y, Kowalski A. 1985.** The insulin receptor kinase. *Biochimie* **1985**: 1119-1124.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. 2003.** Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* **112**: 1796-1808.
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. 2002.** Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* **8**: 1288-1295.
- Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI. 2002.** Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* **277**: 50230-50236.
- Zhang L, Wheatley CM, Richards SM, Barrett EJ, Clark MG, Rattigan S. 2003.** TNF-alpha acutely inhibits vascular effects of physiological but not high insulin or contraction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**: 654-660.

**Webové zdroje:**

**Ashida H.** Applied Biofunctional Chemistry, Biochemistry Frontiers, **dostupné na:** <http://www.ans.kobe-u.ac.jp/english/gakka/seibutsukinou/seibutu.html>

**Pimentel G, Zemdegs JSC. 2009.** Leucine stimulates mTOR and muscle protein synthesis in both animal and human. Dostupné na: <http://www.efdeportes.com/efd131/leucine-stimulates-mtor-and-muscle-protein-synthesis.htm>

**Učebnice:**

**Horton RA, Moran LA, Scrimgeour G, Rawn D.** 2006. Principles of biochemistry. *Prentice Hall*, ISBN-13: 9780131453067